

実験動物としてのショウジョウバエ

浅 田 伸 彦

岡山理科大学理学部生物学教室

はじめに

1988年6月、サイエンス誌に約200ページにわたる実験動物の特集が組まれた。その中の一章にはマウスやヒトなどとともにショウジョウバエが取り挙げられている (Rubin, G. M., 1988)。ショウジョウバエは体長約2ミリの小さなハエで平地、山地、河川沿い、また人家の台所などに広く分布する。世界中に約2,500種、日本国内に約200種、岡山県では1988年までに50種 (ショウジョウバエ属に限る) が採集されている。採集も簡単で、当教室でも瀬戸内海沿岸、中国山地、醸造所、農場などで調査するとともに、毎年学部3年生を対象に中国山地中央部の蒜山高原において実施される「蒜山生物学実習」の一貫として、ショウジョウバエの採集を行ない、貴重なデータを蓄積しつつある。ショウジョウバエのみならず、昆虫類は一般に適応放散の程度が高いことから、生態学的研究対象としても注目されている。また、産業の発達に伴う二次産物に起因すると思われる自然環境の変化など、外部環境に作用する人為的影響の指標種としても重要性を増している (別府, 1985)。なかでもキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は特に遺伝学の研究上欠かせない材料で、今後は遺伝学のみならず分子生物学、発生生物学などの広範な研究領域で用いられると思われる。キイロショウジョウバエは理科の教科書にも掲載されている生物なので、毎日実験室で顔をあわせている、筆者ら以外の人たちにも広く知られているだろう、と思いきや、案外そうでもないらしい。そこで、本稿では多くのショウジョウバエの中でもキイロショウジョウバエに限定し、それが実験動物たる由縁を専門的な記述は避けてできるだけ平易に紹介することにした。はじめに強調したいのは、ショウジョウバエは脊椎こそ

ないものの高等動物であるということである (教科書の裏見返しなどに載っている系統樹を再度みてもらいたい。ヒトなどの脊椎動物などとの高さは等しいことに気が付くだろう!)。ショウジョウバエを対象にした研究は膨大な蓄積があり、筆者1人の力量ではとてもそのすべてをカバーすることはできない。そこで、いわゆる実験動物のなかで、恐らくショウジョウバエでのみ実施が可能であろうと思われる3つの遺伝学的実験系、つまり、1. バランサー染色体を用いた染色体操作, 2. 可動遺伝子 (P 因子) を用いた遺伝子操作, 3. 形態形成に関与する遺伝子を紹介する。最後に、現在筆者らの教室で遂行しつつある研究の一端を披露したい。本稿の要旨は第18回岡山実験動物研究会 (1989年12月2日、特別講演2) で発表した。

1. キイロショウジョウバエとは?

ショウジョウバエは、ハエ (双翅) 目に属し完全変態をする昆虫で、体長は約2ミリにすぎない (図1)。『ショウジョウバエ』という和名は酒を飲み、眼を赤くして舞う『猩々 (能)』に由来し、種小名の『*melanogaster*』は“腹部が黒い”ことを意味しているが、複眼は大きくて赤く、腹部が褐色で、イーストを好むという習性をいみじくも表現している。実験室で用いられ始めたのは今世紀に入ってからで、1910年代から米国・コロンビア大学 (後にはカリフォルニア工科大学) のモルガンらにより壮大な“ショウジョウバエ遺伝学”が開花した。モルガンは、遺伝子は染色体に存在することを明らかにした功績で1933年に遺伝学分野において初のノーベル賞を受賞 (医学・生理学部門) し、彼らの成果は、1946年に同賞を受賞した Muller らと共著で *Mechanism of Mendelian Heredity* (1915) に集大成された。

ショウジョウバエは、世代時間が約10日と短く

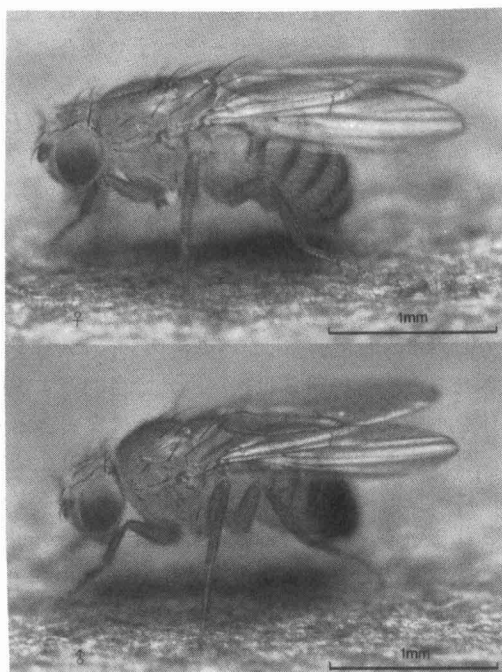


図1. キイロショウジョウバエの野生型(上:雌,下:雄)

(大腸菌は30分, ヒトは30年と概算), 1腹あたりの子の数が多い(1個体あたり100以上, マウスは数個体, ヒトは約2個体), 染色体数が少なく(2倍体あたり8本, ヒトは46本), 大きな唾腺染色体を有し(普通の染色体の数百倍), そして何よりも飼育が易しいという, 実験動物としての利点を持ちあわせている。加えて, 単細胞生物としての大腸菌, 酵母や, 主として培養細胞として使用され

る頻度が高いマウス, ヒトなどの多細胞生物と比較した場合, 中程度の複雑さ(ゲノムサイズで大腸菌の約50倍, 哺乳類の約20分の1)を有する生物として, intactな状態での使用に最適な動物であることから, 細胞から個体, ひいては集団に至るまでの広範なレベルで使用が可能な唯一の生物であるといっても過言ではなからう(表1)。また, 自然科学の研究においては使用する生物ごとの誤差は最小限としたい上, 追試に当たっても世界的に共通する, いわゆる“標準系統”が存在すると好都合な場合が多い。大腸菌ではK-12, マウスではBALB-Cなどが多用されているが, ショウジョウバエにも突然変異体のみならず Oregon-R, Canton-S など多くの野生型系統が知られている。系統名や維持されている研究室を検索するには, 世界的には米国・カンザス大で編集され年に1~2冊発行される, Drosophila Information Service がサーキュレーションが良く, 国内では国立遺伝学研究所発行の Drosophila Stock List in Japan が便利であろう。後者によると国内のショウジョウバエ系統保存研究室は1986年現在46で, 19の標準系統がいずれかの研究室で維持されている。当教室でも標準系統を4系統維持しており, 国内外の地理的系統や突然変異系統も含めて分譲が可能で, 当教室における教育・研究用に供されるのみならず, 毎年主として教育機関からの分譲依頼にも応じている。

表1. いろいろな生物のゲノムサイズ(1倍体あたりのDNA)

生 物 名	分子量	塩基数
大腸菌 <i>Escherichia coli</i>	2.8×10^9	4.2×10^6
酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10^{10}	1.5×10^7
ショウジョウバエ <i>Drosophila melanogaster</i>	10^{11}	1.7×10^8
マウス <i>Mus musculus</i>	1.7×10^{12}	2.7×10^9
ヒト <i>Homo sapiens</i>	2.0×10^{12}	3.2×10^9

2. バランサー染色体を用いた染色体操作

学生実習などでショウジョウバエを用いる場合、必ずと言っていいほど採用されるテーマに「核型分析」と「唾腺染色体の観察」がある。ショウジョウバエの染色体数は2倍体が8本でそれぞれ第1、第2、第3、第4染色体と称される。第1は性染色体で、雌はXXで雄はXYである(図2)。

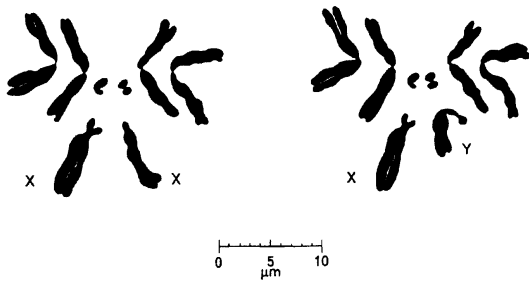


図2. キイロショウジョウバエの核型(左:雌、右:雄)

唾腺染色体は体細胞が対合したもので、約1,000本(平均約10回の複製が連続して起きるので、 $2^{10}=1024$ 本)のDNAコピーが横にレジスター状に並ぶために約5,000本のバンドが縞模様に見え、またバンドにつくタンパクにより濃淡となって観察される。1バンドあたりのDNAは約25,000塩基対といわれている。現在では胚や成虫などからDNAを調製して構造を解析するとともに、クローニングされたDNAとバンド(遺伝子)とを対応させる方法(*in situ* ハイブリダイゼーション)も確立されている。細胞遺伝学的実験法もいろいろ知られているが、自然集団内に最も多い突然変異である劣性有害遺伝子特にホモ接合になると死亡する(致死)突然変異が第2染色体に起きた場合の検出と維持法を例にして、ショウジョウバエならではのバランサー染色体を用いた“染色体操作法”を紹介しよう。1986年版の *Drosophila Stock List in Japan* によると36種のバランサー染色体がリストアップされ、必要に応じて使い分けることができる。

バランサー染色体の特徴は、顕微鏡(慣れれば肉眼!)で見分けられる優性形質(マーカー遺伝子)で標識され、ホモ接合では致死かあるいは不妊になることで、しばしば複雑な逆位があるため

に染色体の乗り換え(交叉)が抑制される。従って、望む遺伝子をバランサーとヘテロ接合にさせることで安定に維持することが可能となる。ここでは第2染色体を例にする。この方法は「*Cy/Pm*法」と呼ばれ優性で致死遺伝子の *Cy* (*Curly*: 翅が反る)と *Pm* (*Plum*: 複眼が暗褐色)を別々の染色体上に持つ。いずれの染色体も組み換えを抑制する作用のある逆位を持つことと、ショウジョウバエの雄では組み換えが起きないことを利用して *Cy/Pm* の雌と調査したい染色体を有する雄を交配させると、雑種第3世代(F_3)で目的とする染色体をホモ接合にさせることが可能になるとともに、維持することも可能になる(図3)。第2染色体には劣性致死遺伝子が450~500個存在すると推定されている。私たちの教室でも遺伝子座が非常に近接し常法とされる組み換え体(recombinant)の選択法で得るには効率が悪い突然変異系統(*b tyr-1/b tyr-1*)から、必要な系統を本法を応用することで分離(*tyr-1/tyr-1*), 維持することができた。

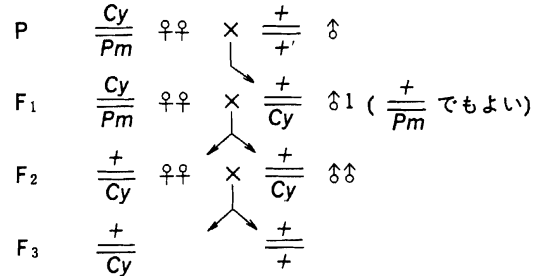


図3. 第2染色体のホモ接合法(*Cy/Pm*法)

3. Pエレメントを用いた遺伝子操作

ある機能を務める遺伝子の遺伝子座がわかったとしてもその遺伝子産物が不明かあるいは機能に直接結びつくとは限らないことがしばしばある。たとえば、生物時計をコントロールする *per* (*period*) 遺伝子の産物が細胞によって合成される糖タンパクのプロテオグリカンであったり、学習(ショウジョウバエも学習する!)の変異 *dnc* (*dunce*) の遺伝子産物がcAMPのホスホジエステラーゼであったりする。今日では通常の分子生物学的手法に基づいて遺伝子DNAを抽出してクローニングし、

動く遺伝子 (movable gene) を利用して任意の遺伝子を再度ゲノム内へ戻していわゆるトランスジェニック個体レベルで発現させる「Pエレメント法」が多用されている。本法の利点は任意遺伝子のゲノム内への転移を遺伝的にコントロールすることができる点にある。遺伝子のクローニングに象徴される分子生物学にとっては大腸菌と、ベクター (遺伝子の運び屋) としてのプラスミドの寄与が大きいが、本法は、Pエレメントの中央部に任意のDNAを挿入して作製した人工ベクターをショウジョウバエの初期胚に微量注入すると形質転換個体を高頻度で得ることができることが特徴である。また、任意の遺伝子に試験管内 (*in vitro*) で人為的に変異を起こさせた後に生体内 (*in vivo*) における発現を確認することも可能になる。このように多彩な分子生物学的アプローチが可能であることはショウジョウバエはもはや“多細胞大腸菌”レベルに達したと言えるかもしれない。

ここで、Pエレメントについて説明する必要がある。ショウジョウバエのある異なる系統間の交配時に限って高突然変異、雄における組み換え、不妊などの現象が70年代から観察され、それらの現象はハイブリッド・ディスジェネシス (交雑発生異常) と呼ばれるようになった (Kidwell *et al.*, 1977)。異常は交配型によって異なり、異常が起きる交配に用いた雄の系統をP (P系統)、雌の系統をM (M系統) と呼ぶ。雌雄を逆にした交配やそれぞれの系統内の交配時には何ら異常は起こらない (図4)。このような現象は次のように説明される。P系統のみの染色体上に異常を誘発する因子 (Pエレメント) が存在し、その因子はM系統の細胞質 (Mサイトタイプ) 内でのみ活性を有する。

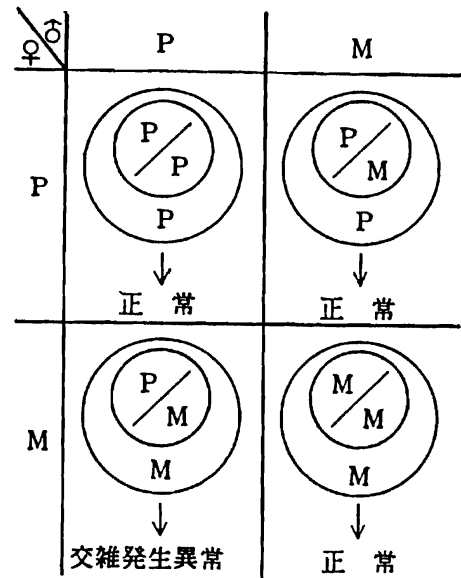


図4. ハイブリッド・ディスジェネシス (交雑発生異常)

サイトタイプは染色体上にP因子があるとP系統の細胞質 (Pサイトタイプ) に転換される。長年実験室で維持されている標準系統のほとんどはM系統であるが、アメリカ国内の野生型は殆どPタイプであるのに対して日本国内で野外採集された系統の多くはPとMの中間タイプ (Q系統) で、Pサイトタイプであるにもかかわらずディスジェネシスを起こす能力がない。ちなみに、標準系統のOregon-R, Canton-SなどはM系統である。分子生物学的手法でPエレメントの本体が明らかにされたのは80年代初期であった。Pエレメントは全長2,907塩基対で転移を触媒する酵素をコードしていることや、DNAの両端に逆向きの反復配列があり、その配列が転移先の遺伝子の両端を認識して転移することが明らかになった (図5)。

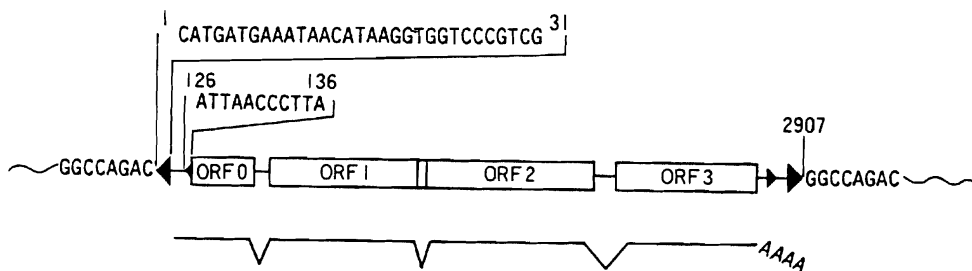


図5. P因子の構造 (数字は塩基対の番号)

Pエレメントの中央近辺に任意のDNAを挿入し、それによって転移酵素はコードするけれども組み込めないようになった“融合遺伝子”を形成させることが可能になり、それを発生学的手法で初期胚に微量注入するのである。このような人工Pエレメントを一種のベクターとして取り扱うことができるようになり、神経系における伝達機能など高等動物としての基本的機能や形・区画の形成といった生体高次構造・機能を分子レベルで解析する道が開けてきた。

4. 形態形成に関与する遺伝子

前にも述べたように、ショウジョウバエの遺伝学的研究は1910年代からモルガンらによって始められたが、1960年代からは発生学的な研究も始まりだした。ショウジョウバエの幼虫には既に成虫になった時に成るべき組織・器官が“決定(determination)”されているが“分化(differentiation)”はしていない、成虫原基が存在する。完全変態する昆虫なので、羽化して成虫になった時の頭部、胸部（腹部は原基構造をとらない）になるべき部位が幼虫期にすでに決まっているというわけだ(図6)。初期発生の過程の詳細な観察により、卵の前後軸、背腹軸の決定は母性因子により遺伝的に制御されていることがわかってきた。ショウジョウバエの幼虫は11の体節から成る分節構造をしてい

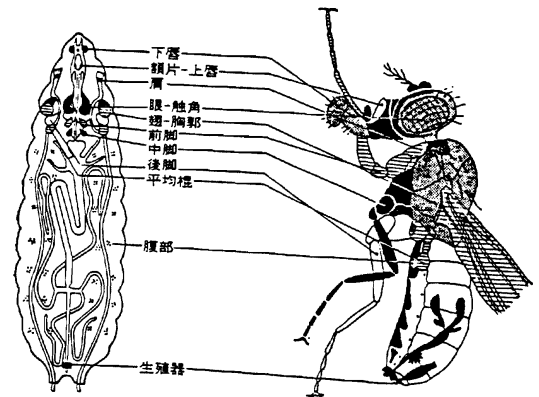


図6. 3 齢幼虫の成虫原基と成虫構造の対応

るが、それらの構造もまた遺伝的にコントロールされている。正常発生では成虫になると各体節の分化が起き、頭部は複眼や触角に、胸部は1対の翅や3対の脚に、腹部は外部生殖器などにそれぞれ分化する。しかし、体節構造にかかわる遺伝子に突然変異が起きると幼虫では体節の欠損・重複などの異常が起き(図7)、またホメオティック変異と呼ばれ、成虫のある体節が他の体節に転換され、触角になるべき部位が脚になったり翅が4枚(正常個体は2枚)になったりすることもある。1980年代からホメオティック変異を起こす遺伝子(ホメオティック遺伝子)がクローニングされ構造や発現様式の解明が進んでいる。また、塩基配

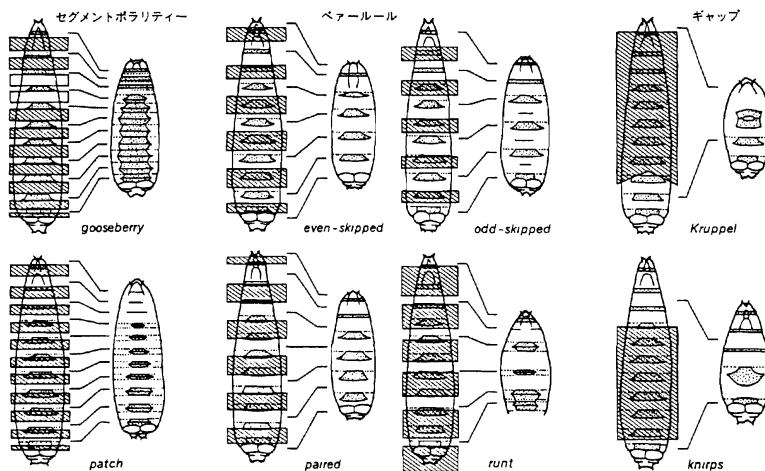


図7. 体節を構成する遺伝子と表現型(斜線部は欠損部位)

列に保存されている領域も発見され、ホメオボックスと呼ばれている。ショウジョウバエには16の遺伝子が知られているが(Gehring, 1987), ヒトをはじめ、マウス、カエル、ミミズ、ショウジョウバエ以外の昆虫などの様々な動物種についてもホメオボックス遺伝子が発見され、それらの塩基配列を比較した結果、非常に高い相同性が検出されている。ホメオボックスの機能はDNAへの結合であると考えられているが現在解析が進められている。

5. 当研究室における研究

第2～4節で“ショウジョウバエ特異的”な3つのテーマを紹介してきたが、最後に現在私たち(岡山理科大学理学部生物学教室)が遂行しつつある実験・研究の概略を紹介させて頂きたい。

リンゴの皮を剥いた時の褐変化、真っ黒の頭髮などにみられるようにメラニン化はヒトを含む動植物に共通にみられる馴染み深い現象である。メラニン化はアミノ酸・チロシンを基質とする一連の酵素反応で、鍵となる酵素はフェノールオキシダーゼと呼ばれる。この酵素が欠損するとシロウサギなどの白子(アルビノ)になる(図8)。最近美容面でも注目され、フェノールオキシダーゼの活性を阻害することにより、日焼けなどによるしみ・そばかすなどを予防する化粧品も市販されている(女性には御存じの方もおられるのでは?)。メラニン化の過程はマウスなどの脊椎動物とショウジョウバエなどの無脊椎動物では大きく異なる。

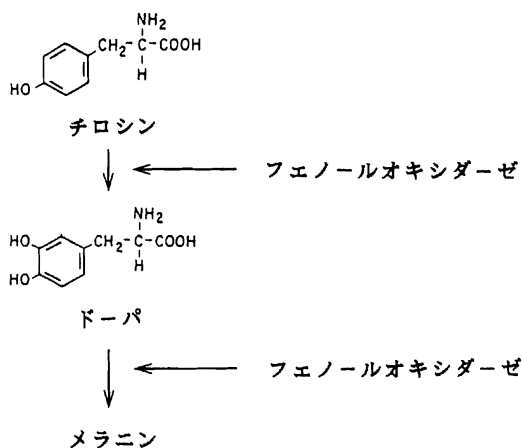


図8. メラニン生合成の過程

脊椎動物ではメラノサイト(色素形成細胞)で本酵素がすでに活性化した状態で分泌されるのに対し、無脊椎動物はメラノサイトを持たず不活性の状態(前駆体)として存在し(Ohnishi, 1953), 複雑なカスケード反応を経て活性化される。植物や微生物に関する報告は少ない(Lax *et al.*, 1984)。活性化には種々の物質が介在し、カイコ(芦田, 1988)やショウジョウバエを用いて分離・精製されつつあるが、それらの詳細は明らかではない。また、ショウジョウバエでは本酵素の活性は発生段階によって変化し、幼虫の3齢後期(ショウジョウバエの幼虫期は1, 2, 3齢)でかつ蛹になる直前(ガラス製管瓶で飼育すると、湿気を嫌うために管壁にそって昇ってくる時期)に最高になる(Ohnishi, 1953)。本酵素には昆虫の外上皮の主成分であるクチクラを硬くする作用もあるので、恐らく3齢幼虫の上皮を硬くして蛹になる準備をしているのであろう。一方、フェノールオキシダーゼをコードする遺伝子の探索も精力的に行なわれ、1987年にマウスで(Yamamoto *et al.*, 1987), 同年の数ヶ月後にヒトで(Kwon *et al.*, 1987) cDNAの構造が明らかにされたが、無脊椎動物や植物に関する知見は未だ報告されていない。

私自身の「フェノールオキシダーゼ」との出会い、大学院学生時にさかのぼる。当時は系統学上キロショウジョウバエとは異なる亜属のハエを用いて“種の分化”という大きいテーマで実験していた。「種」の形成にあたっては様々な要因によって元の集団からの隔離が必要十分条件になり、なかでも、交尾できないとかたとえ交尾に成功しても不妊であったり産卵できなかったりといった生殖的な隔離がもっとも大きな要因になる。実験室内での異種間交尾の際に産卵を阻止する反応にフェノールオキシダーゼが関与していることを示唆する結果を得たのである(Asada and Fukumitsu, 1990)。本酵素は、免疫系を持たないショウジョウバエなどの昆虫にとって内因性の異物の認識にも寄与しているといわれ、生体にとって重要な酵素の1つであるとの認識から、まずは遺伝子の構造を明らかにし、発現調節機構・遺伝的変異の有無と程度・他種生物との相同性の程度・アミノ酸配列の推定と相同性の程度などを調査するとともに

ひいては活性化反応過程に介在する分子種の構造と機能を明らかにし、活性化機構の全貌を解明したいと願っている。現在ショウジョウバエの標準系統から DNA ライブラリーを構築し、若干の結果を得つつあるが現実には厳しい！。

おわりに

現在、ショウジョウバエを用いた研究者人口は“ウナギ昇り”に増え続けている。遺伝学系の学術雑誌に「*Drosophila melanogaster*」の22字が見あたらないことはないと言っても過言ではない。従って、本稿で紹介したトピックス以外にも世界中の研究室で日々多彩な研究が行なわれ、新たにユニークな技術が考案されていることは言を待たない。私たち、人類が抱える究極的な課題ともいえる2大柱，“脳”と“ガン”に関してもショウジョウバエはモデル動物として実験に役だっている。発生生物学の進展とも相まって発生における形態形成、細胞の接着や増殖、区画などの諸問題はいずれの生物にとっても基本的かつ本質的な生物現象であり、脳の形成と細胞の癌化は表裏一体をなしていると言えなくもない。マウスにおける中枢神経系に異常をきたす系統(御子柴, 1988)や発癌遺伝子の分離などを思い起こす時、突然変異体の分離と研究が他種をよせつけないまでに格段に進んでいるショウジョウバエの利用あるいは本種で得られた情報を無視することはできないであろう。

以上のように、ショウジョウバエはその生体機能が私たち哺乳動物と基本的に異ならない(Rubin, 1988)という点は実験動物としての第1条件を見事にクリアーし、今後も特に genetic tool として需要が高まることはほぼ疑いなかろう。ただ、ここで欠点も指摘しておかなければならないだろう。それは、わずか2ミリの体長、これがネックといえる。大量のサンプルを必要とする生化学、微小電極の挿入などを伴う電気生理学などなど…このようなテーマにとっては本種は向かない。そして最後に最大の難点、競争が激しい！

謝 辞

筆者に研究会における発表の機会を与えて頂きました岡山大学農学部猪 貴義、佐藤勝紀、同医

学部片山泰人の諸先生、本稿に関して貴重な御助言を頂きました岡山理科大学理学部大西英爾先生に感謝いたします。

参考文献

- Asada, N., and Fukumitsu, T. (1990) Reaction mass formation in the insemination reaction in *Drosophila*, with notes on a phenoloxidase activation. *Zool. Sci.* 7: 79-84.
- 芦田正明 (1988) 昆虫血液のフェノール酸化酵素前駆体活性化系, 化学と生物 第26巻: 425-435.
- 別府 桂 (1985) 志賀高原の湖沼の汚染状況—ショウジョウバエを指標種にして—信州大学環境科学論集, 第7号: 66-70.
- Gehring, W. J. (1987) Homeo boxes in the study of development. *Science* 236: 1245-1252.
- Kidwell, M. G., Kidwell, J. F., and Sved, J. A. (1977) Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. A syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination. *Genetics* 86: 813-833.
- Kwon, B. S., Haq, A. K., Pomerantz, S. H., and Haraban, R. (1987) Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 7473-7477.
- Lax, A. R., Vaughn, K. C., and Templeton, G. E. (1984) Nuclear inheritance of polyphenol oxidase in *Nicotiana*. *J. Heredity* 75: 285-287.
- 御子柴克彦 (1988) 哺乳類中枢神経系の発生と分化, 岡山実験動物研究会報, 第6号: 6-11.
- Morgan, T. H., Sturtevant, A. H., Muller, H. J., and Bridges, C. B. (1915) *The Mechanism of Mendelian Heredity*, Henry Holt and Company, New York.
- Ohnishi, E. (1953) Tyrosinase activity during puparium formation in *Drosophila melanogaster*. *Jpn. J. Zool.* 11: 69-74.
- Rubin, G. M. (1988) *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science* 240: 1453-1459.
- Yamamoto, H., Takeuchi, S., Kudo, T., Makino, K., Nakata, A., Shinoda, T., and Tateuchi, T. (1987) Cloning and sequencing of mouse tyrosinase cDNA. *Jpn. J. Genetics* 62: 271-274.